

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 好熱好酸性アーキアのメバロン酸経路に含まれる
ATP 依存性脱炭酸酵素ホモログの研究

氏名 本山 賢人

論文内容の要旨

イソプレノイドは自然界最大の天然有機化合物群であり、現在までに 80,000 種以上の化合物が見出されている。この中には生命活動において重要な生理作用を示す化合物や、産業利用価値の高い化合物が多数含まれており、それらすべてのイソプレノイドは生体内においてイソペンテニルニリン酸 (IPP)、およびその構造異性体であるジメチルアリルニリン酸を共通の前駆体としている。これら前駆体の生合成を担う代謝経路の 1 つとして、メバロン酸 (MVA) 経路が知られている。近年、真核生物やバクテリアに並ぶ第 3 の生物ドメインであるアーキアに関する研究により、真核生物などが有する古典的 MVA 経路とは一部異なる代謝中間体を経由する変形 MVA 経路の存在が明らかにされた。このような MVA 経路の多様性が生じる一因として、古典的 MVA 経路中のジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (DMD) とアミノ酸配列相同性を有しながらも、それとは異なる機能を有する複数の DMD ホモログの存在が挙げられる。本研究では、触媒メカニズムの全容が不分明である DMD と、そのホモログでありながら DMD とは異なる触媒機能および基質特異性を有する MVA 3-キナーゼ (M3K) に着目した。DMD 反応では、5-ジホスホメバロン酸 (MVA-5-PP) の 3 位水酸基がリン酸化され、推定反応中間体 3-ホスホ-5-ジホスホメバロン酸 (MVA-3-P-5-PP) が生じる。その後、触媒作用によって同中間体の 3 位リン酸基が脱離し、これに伴う脱炭酸反応が進行し、IPP が生じる。これに対し、M3K 反応では MVA が基質となり、その 3 位水酸基がリン酸化されて 3-ホスホメバロン酸 (MVA-3-P) が生じる。しかし、DMD のような 3 位リン酸基の脱離および脱炭酸反応は触媒されない。この反応は DMD 反応の前半部分である、MVA-5-PP の 3 位水酸基のリン酸化と MVA-3-P-5-PP の生成によく似ているため、これら酵素の共通点と相違点は大変興味深い。そこで、X 線結晶構造が明らかにされている *Sulfolobus solfataricus* 由来 DMD (SsoDMD) と *Thermoplasma acidophilum* 由来 M3K (TacM3K) を用いて両酵素の活性部位の構造

を比較したところ、2つの大きな相違点が見出された。

相違点の1つ目として、SsoDMDではMVA-5-PPの3位水酸基に近接する位置にDMD間で保存されているアスパラギン酸残基 Asp281が存在しているが、TacM3Kではそれが Thr275に置き換わっていることが挙げられる。過去に提唱されたDMDの触媒反応に関する仮説であるプロトン引き抜き機構では、このアスパラギン酸残基が塩基触媒として働き、MVA-5-PPの3位水酸基からプロトンを引き抜くことで、基質であるMVA-5-PPの3位リン酸化反応が促進され、MVA-3-P-5-PPを推定反応中間体として生じる。その後、同中間体の3位リン酸基が酵素触媒によって脱離し、カルボカチオン中間体を経て脱炭酸反応が進行し、IPPが生じる。ここでは、最初に水酸基からのプロトンの引き抜きが起こらなければ、その後の3位リン酸化反応、および3位リン酸基の脱離に伴う脱炭酸反応は進行しないとされていた。しかし、TacM3Kの活性部位では同アスパラギン酸残基と対応する位置に、塩基触媒として働き得ないスレオニン残基が存在しているにもかかわらず、MVAの3位リン酸化反応が触媒される。これはプロトン引き抜き機構と明らかに矛盾していた。そこで第2章の研究では、DMDの構造中でこのアスパラギン酸残基が反応のどの段階(MVA-5-PPの3位ヒドロキシ基のプロトン引き抜き、リン酸化、脱炭酸反応)に寄与しているのかを調べるため、SsoDMDのAsp281への部位特異的な変異導入を行い、SsoDMD(D281N)、SsoDMD(D281T)およびSsoDMD(D281V)をそれぞれ構築した。その後、放射標識基質(MVA経路代謝中間体)および順相TLCを用いて各変異体酵素の反応生成物を分析することにより、それらの機能評価を行った。その結果、SsoDMD(D281N)では、アスパラギン酸残基が塩基触媒として機能できないアスパラギンに置換されてもDMD活性を保持しており、野生型酵素には劣るもののIPP合成活性が確認された。この結果より、DMDの構造中においてもアスパラギン酸残基によるプロトン引き抜き機構が強く否定された。一方、Asp281を非極性アミノ酸残基であるスレオニンまたはバリンに置換したSsoDMD(D281T)およびSsoDMD(D281V)は脱炭酸活性を失い、MVA-5-PPより極性の高い化合物を生成した。この変異体生成物を¹³C-NMRおよびESI-MS分析に供した結果、MVA-3-P-5-PPであることが示された。同化合物は、1959年にBlochらがDMDの反応中間体として提唱して以来、実に半世紀以上の間その存在が推測の域を出なかったが、本研究で初めて酵素反応生成物として同定する事に成功した。これらの結果から、SsoDMDのAsp281は脱炭酸反応の触媒に寄与していることが強く示唆された。

TacM3KおよびSsoDMDの構造比較から見出された相違点の2つ目に、TacM3Kの活性部位では基質であるMVAの5位水酸基と近接する位置にGlu140が存在しているのに対し、SsoDMDの活性部位で対応する位置にはGly140が存在している事が挙げられる。さらには、既知のDMDホモログのアミノ酸配列を用いた多重配列アライメントが示すように、5-ホスホメバロン酸(MVA-5-P)を基質とする好塩性アーキア由来のホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(PMD)では、上記のアミノ酸残基と対応する位置にアラニンが保存されていた。これらの知見から、TacM3KおよびSsoDMD

構造中でそれらのアミノ酸残基が規定する空間的な広さの差が、両酵素間における基質特異性の違いを生じさせる原因であると予想した。そこで第 3 章における研究では、TacM3K の Glu140 に対して部位特異的な変異導入を施し、TacM3K (E140A)、TacM3K (E140S)、および TacM3K (E140G) をそれぞれ構築した。第 2 章と同様にこれら変異体酵素の機能評価を行った結果、興味深いことに全ての変異体が TacM3K 本来の基質では無い MVA-5-P に反応性を示し、極性の高い化合物を生成した。同化合物の構造決定のため、同生成物を ^{13}C -NMR および ESI-MS 分析に供した結果、MVA-5-P の 3 位水酸基がリン酸化された 3,5-ビスホスホメバロン酸 (MVA-3,5-BP) である事が示された。つまり、Glu140 の置換によって TacM3K の基質特異性改変に成功したと言える。特筆すべきは、TacM3K 変異体が触媒する MVA-5-P の 3 位水酸基のリン酸化反応と同一反応を触媒する酵素はこれまで自然界からは同定されておらず、同反応は非天然の酵素反応であるという点である。そこで筆者は、この TacM3K 変異体が触媒する酵素反応と既知の MVA 経路関連酵素を組み合わせ、これまで自然界からは見つかっていない人工 MVA 経路の構築を試みた。実際にこの人工 MVA 経路が大腸菌内で機能するのかをリコペン生産を指標として評価した結果、同経路が大腸菌内で機能する事が強く示唆された。以上の研究成果から、TacM3K および SsoDMD の間で基質特異性に違いが生じる原因の一端を解明することができた。

第 4 章における研究では、次世代バイオ燃料として有望視されている化合物、イソプレノールに着目し、同化合物を MVA から直接合成する人工酵素 MVA デカルボキシラーゼ (MVD) の作製に向けたスクリーニング系の構築を行った。第 2 章および第 3 章の研究から得られた知見から、野生型 TacM3K 遺伝子あるいは DMD の構造を模倣する目的で構築した TacM3K (T275D) 遺伝子へのランダム変異導入により、MVD に必要な構造的要素を獲得させて、同人工酵素を作製しようという着想に至った。これに先立ち、膨大なランダム変異ライブラリーから MVD 活性を示す変異体を効率よく選抜する方法を考案し、これに必要なイソプレノールからリコペンを合成するイソプレノール検出大腸菌、ST-IT 株の構築に成功した。今後は同菌株を用いたスクリーニング法の改良および新たな手法の開発に取り組み、MVD の作製へ繋げる予定である。

本研究は、MVA 経路の多様性が生じた一因である DMD ホモログ酵素に着目し、SsoDMD と TacM3K の構造比較から得られた知見を基に両酵素の変異解析を行ったものである。これにより、過去に提唱された仮説を覆し、新たな DMD の触媒メカニズムを提唱した。同時に、DMD ホモログ間の基質特異性に違いが生じる原因の一端を解明し、その分子進化の歴史を辿るための新たな知見を提示した。さらに、構築した TacM3K 変異体と既知の酵素を組み合わせることで人工 MVA 経路を構築し、大腸菌内で機能させることに成功した。また、人工酵素 MVD の作製に向けたスクリーニング系の構築を行った。以上から、本研究は学術的な側面だけでなく、応用研究への広がりも視野に入れた研究と言える。